

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 4 日
Date of Application:

REC'D 29 APR 2004

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 2 0 0 6 8
Application Number:

WIPO PCT

[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 2 0 0 6 8]

出 願 人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s):

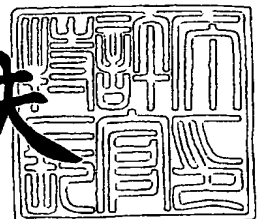
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 AB03010J

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/70

【発明者】

 【住所又は居所】 青森県弘前市取上 2 丁目 1 2 - 1

 【氏名】 長内 智宏

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100100181

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 阿部 正博

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 053419

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0202927

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 14員環マクロライド化合物を利用した、血管平滑筋の増殖に起因する疾患治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤。

【請求項2】 血管平滑筋がヒト冠血管平滑筋であることを特徴とする、請求項1に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。

【請求項3】 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項1又は2に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。

【請求項4】 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項3に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。

【請求項5】 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。

【請求項6】 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項5に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。

【請求項7】 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項6に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。

【請求項8】 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤。

【請求項9】 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症または慢性血管硬化症である、請求項8に記載の予防治療剤。

【請求項10】 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、又は心筋梗塞症である、請求項8に記載の予防治療剤。

【請求項11】 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又

はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項 8～10 のいずれか一項に記載の予防治療剤。

【請求項 12】前記 14 員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項 11 記載の予防治療剤。

【請求項 13】治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法。

【請求項 14】細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階を有意に抑制することを特徴とする、請求項 13 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

【請求項 15】細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階の抑制が、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであることを特徴とする、請求項 14 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

【請求項 16】細胞周期における G1 期から S 期に向かう段階の抑制が、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) の発現を増強することによってもたらされるものであることを特徴とする、請求項 14 又は 15 記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

【請求項 17】治療に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法。

【請求項 18】予防に有効な量の 14 員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再開塞を防止する方法。

【請求項 19】前記投与工程は経口投与によって行われる、請求項 13～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】前記 14 員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、請求項 13～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】前記 14 員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤及びその治療方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

エリスロマイシン及びロキシスロマイシン等に代表される14員環マクロライド系化合物は、メチル側鎖等を有する14員環ラクトンにジメチルアミノ糖又は中性糖などが結合した放線菌により生産される抗生物質であり、従来から種々の感染症、たとえば、グラム陽性菌、ある種のグラム陰性菌、マイコプラズマやクラミジア等において、その強力な抗菌活性によって臨床上幅広く利用されている。その作用機序は、細菌の70Sリボゾームの50Sサブユニットに作用し、ペプチド転移酵素反応を阻害して蛋白質合成を抑制するものである。

【0003】

近年に至り、虚血性心疾患の患者は、健常人に比べ、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) に対するIgG抗体価が有意に高値であるとの報告がなされている (例えば、非特許文献1参照)。

【0004】

さらに、肺炎クラミジアの感染が、虚血性心疾患の発生頻度を2～4倍増加させているとの、疫学的な研究報告もなされている (例えば、非特許文献2参照)。かかる疫学結果を支持するような研究として、剖検患者の心冠動脈におけるアテローム病変部位に、当該病原体を高率に検出させるとの報告もなされている (例えば、非特許文献3参照)。

【0005】

一方、マクロライド系化合物に属するラパマイシン (rapamycin) 等は、血管平滑筋の増殖抑制活性を示すことが知られており、本活性が種々のサイトカイン等による増殖刺激を阻害することでもたらされていることが明らかとなっている (例えば、非特許文献4参照)。

【0006】

【非特許文献1】

Saikku et al., Lancet, No.2, pp983-986, 1988

【非特許文献 2】

Danish et al., Lancet, No.350, pp430-436, 1997

【非特許文献 3】

Shor et al., Surgery after Medicine Journals, No.82, p158, 1992

【非特許文献 4】

Mario et al., Z Kardiol, Supple 3, ppIII/49-III/57, 2002

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

最近では、心臓の冠動脈閉塞をバルーンで拡大する治療が行われているが、手術後に再度閉塞が起き、臨床上の問題となっている。これは血管の平滑筋が血管内膜のキズを刺激に増殖し、キズの部分の平滑筋が肥大することが原因とされている。

【0008】

しかしながら、前述のラパマイシンは細胞毒性が強く、これを投与すると動物の免疫力が低下するために、種々の副作用が生じるという問題点がある。従って、特に、上記のような平滑筋の肥大を防ぐ臨床上有効な手段として使用することが出来るような、血管平滑筋への直接的な増殖阻害活性に基づく有効でかつ実用的な疾患の治療剤は未だに提供されていないのが実情である。

【0009】

そこで、本発明では、上記課題を解決し、血管平滑筋増殖に起因する疾患に対する、新規な予防又は治療の為の薬剤（予防治療剤）を提供することを目的とする。

本発明者は、かかる事情に鑑み、鋭意研究した結果、ラパマイシン等の巨大な分子量を有するものではなく、14員環マクロライド系化合物が直接的に血管平滑筋増殖抑制作用を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、以下の各態様に係る発明を提供するものである。

1. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤。

2. 血管平滑筋がヒト冠血管平滑筋であることを特徴とする、態様1に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
3. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様1又は2に記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
4. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様3記載の血管平滑筋増殖抑制剤。
5. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。
6. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様5に記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。
7. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様6記載のサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤。
8. 14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤。
9. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症または慢性血管硬化症である、態様8記載の予防治療剤。
10. 前記血管平滑筋の増殖に起因する疾患は、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、又は心筋梗塞症である、態様8記載の予防治療剤。
11. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様8～10のいずれか一項に記載の予防治療剤。
12. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様11記載の予防治療剤。
13. 治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法。
14. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階を有意に抑制することの特徴とする、態様13記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

15. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階の抑制が、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであることを特徴とする、態様14記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

16. 細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階の抑制が、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) の発現を増強することによってもたらされるものであることを特徴とする、態様14又は15記載の血管平滑筋増殖の抑制方法。

17. 治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法。

18. 予防に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再閉塞を防止する方法。

19. 投与工程は経口投与によって行われる、態様13～18のいずれか一項に記載の方法。

20. 前記14員環マクロライド化合物は、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体から選ばれる、態様13～19のいずれか一項に記載の方法。

21. 前記14員環マクロライド化合物がロキシスロマイシンである、態様20に記載の方法。

【0011】

本発明の14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋増殖抑制剤の好ましい態様によれば、該血管平滑筋増殖抑制剤は、血管平滑筋の細胞周期におけるG1期 (DNA合成準備期) からS期 (DNA合成期) に向かう段階を有意に抑制することを特徴とする。

【0012】

本発明の増殖抑制剤の対象となる血管平滑筋は血管壁に見られ、緊張の保存と収縮にあずかる不随意筋である。その由来動物種、その部位等に関して特に制限はなく、代表的な例として、例えば、冠血管平滑筋及び大動脈血管平滑筋等を挙げることができる。本発明の増殖抑制剤は特に、ヒト冠血管平滑筋の増殖抑制に有効であり、従って、心臓の冠動脈閉塞のバルーンでの拡大治療手術後の再閉塞防止に有効である。

【0013】

本明細書中の実施例で示されているように、血管平滑筋の細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階の抑制は、真核生物の細胞周期の進行に中心的な役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs) の中心的な分子であるCDKIs-p27の発現が増強されることによってもたらされるものである。従って、本発明はまた、14員環マクロライド化合物を有効成分とする、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) 発現増強剤に係るものである。

【0014】

更に本発明は、14員環マクロライド化合物を有効成分とする、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤に係るものである。かかる疾患の代表的な例としては、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症及び慢性血管硬化症、並びに、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、及び心筋梗塞症等を挙げることができる。

【0015】

本発明は、治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋増殖の抑制方法に係る。本明細書中の実施例で示されているように、かかる血管平滑筋増殖の抑制は、リン酸化網膜芽腫遺伝子産物の生成の抑制によってもたらされるものであり、更にこれは、サイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs-p27) の発現を増強することによってもたらされるものである。本発明は、又、治療に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、血管平滑筋の増殖に起因する疾患の治療方法に係る。更に、予防に有効な量の14員環マクロライド化合物を投与することを含む、心臓の冠動脈閉塞手術後の再閉塞を防止する方法にも係る。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明において有効成分として使用される14員環マクロライド化合物の種類に特に制限はなく、当業者に公知の任意の14員環マクロライド化合物を使用することができる。

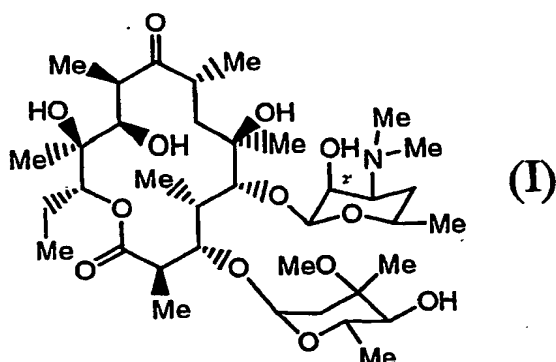
【0017】

14員環マクロライド化合物は、本発明では、下記式 (I) で表されるエリス

ロマイシン若しくは、下記式 (II) で表されるロキシスロマイシン、又はそれらの誘導体であることが好ましい。

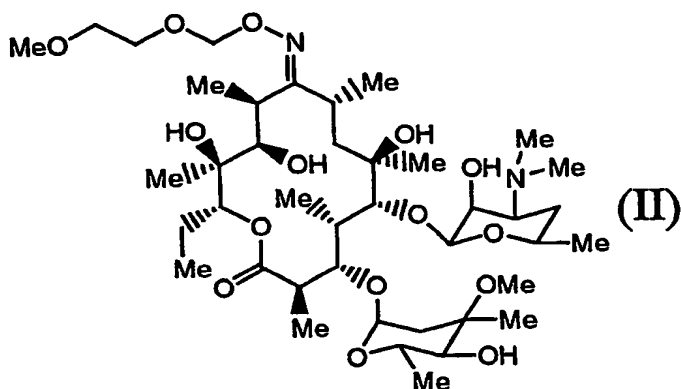
【0018】

【化1】



【0019】

【化2】



【0020】

かかる14員環マクロライド化合物は公知の化合物であり、試薬、工業原料として容易に入手可能である。因みに、エリスロマイシン塩酸塩の急性毒性（マウスLD₅₀）は、 $425.6 \pm 15.7 \text{ mg/kg}$ （静脈）及び $490 \pm 30.4 \text{ mg/kg}$ （腹腔）である。

【0021】

本発明に用いられる14員環マクロライド化合物は、当業者に公知の任意の塩

又はエステルを形成してもよい。かかる塩における好ましい例としては、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、酸性又は塩基性アミノ酸との塩などが挙げられる。酸、塩基は、当該化合物 1 分子に対し、0.1～5 分子の適宜な比で塩を形成する。

【0022】

無機酸との塩の好ましい例としては、たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などとの塩が挙げられ、有機酸との塩の好ましい例としては、たとえば、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

【0023】

無機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。また、有機塩基との塩の好ましい例としては、たとえば、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、メグルミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

【0024】

酸性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられ、塩基性アミノ酸との塩の好ましい例としては、たとえば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられる。

【0025】

エステル体の例としては、2'-アセチルエステル体、及び油脂（各種脂肪酸とのエステル体）等を挙げることが出来る。

【0026】

又、14員環マクロライド化合物の「誘導体」とは、当業者に公知の任意の誘導体、例えば、各種エリスロマイシン誘導体を意味する。

【0027】

本発明に用いられる化合物を予防治療剤として使用する場合は特に限定されず、経口投与若しくは非経口投与（たとえば、筋肉内投与、静脈内投与

、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など) のいずれでもよい。

【0028】

本発明方法における活性成分の有効な投与量は、症状の程度、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与の時期、間隔、医薬製剤の性質、調剤などを総合的に勘案して適宜選択することができる。投与量は、特に限定されないが、通常成人1日あたり約0.1～2000mg、好ましくは約1～1000mgであり、より好ましくは10～500mgであり、これを、通例、1日1～4回にわけて投与する。1日1回投与の場合の投与量合計が0.1mg以下では予防治療効果が得られず、1日4回投与での投与量合計が2000mg以上では、薬剤の血中濃度が上昇し、発疹等を引き起こすおそれがある。

【0029】

本発明の各薬剤は、当業者に公知の任意の方法に従って製造することが出来る。その形態は投与経路等に応じて適宜選択することが出来、例えば、経口投与のための製剤としては、たとえば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、口腔内崩壊錠、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては、たとえば、注射剤、点滴剤、坐薬、吸入剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。尚、これら薬剤にはその形態等に応じて、製薬業界において通常使用されるような、当業者に公知の任意の各種補助物質を適宜含むことが出来る。又、これら薬剤中の活性成分の含有量は、その形態等にもよるが、通常、1～10重量%程度である。

【0030】

【実施例】

以下の実施例では、ヒト冠血管平滑筋細胞であるCASMCs細胞の培養実験、CASM Cs細胞増殖阻害試験、細胞周期解析法、ウエスタンブロット法等を利用して、本発明で使用される14員環マクロライド化合物が血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を有することを示して、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されない。

【0031】

【実施例 1】

CASMCs細胞培養法：ヒト冠血管平滑筋細胞（CASMCs）をClonetics社より購入し、付属の培養キット（SmGM-2）を用いて37℃の5%CO₂条件下で培養し、細胞培養液中には5%牛胎児血清、2ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）、5μg/ml 牛インシュリン、0.5ng/ml ヒト上皮増殖因子（FGF）等を添加して培養を行った。

【0032】**【実施例 2】**

CASMCs細胞増殖阻害試験：CASMCs細胞を前記の方法によって96穴プレートに培養し、一定時間経過後細胞が70～80%近く各穴の培養面を埋めてきた時点において、24時間の血清非存在条件下による細胞の栄養枯渇状態を設定させて後、被検物質であるロキシスロマイシン（RXM）を種々の濃度（0.1, 1.0, 10, 100 μg/ml）で添加し、被検物質の添加後24時間から72時間の培養後、各経過時点での細胞の増殖程度を、タカラPremix WST-1 Cell Proliferation Assay System Kitを用いて、WST-1試薬によるフォルマザン形成発色試験方法によって比色定量した。具体的には、Premix WST-1 を10 μl ずつ加え、2～4時間後に440 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

【0033】

図1のFigure1Aに示されるように、RXMはCASMCs細胞の増殖を、陰性コントロールであるRXM非添加群と比して、RXMが1および10 μg/mlの両濃度において、経時観察を行った時点のいずれにおいても、統計的に有意なレベルで増殖阻害を示した。

【0034】

又、図1のFigure1Bに示されるように、RXMはCASMCs細胞の増殖を、陰性コントロールであるRXM非添加群と比して、RXMが1～100 μg/mlの濃度に渡って、薬物濃度依存的に統計的に有意なレベルで増殖阻害を示した。

【0035】**【実施例 3】**

CASMCs細胞増殖阻害試験（その他の抗菌剤）：一方、その他の抗菌剤を被検物

質として用いて同様な試験系で行ったところ、図2に示されるように、抗菌剤の代表であるAmpicilin (ABPC; 50 μ g/ml) およびGentamicin (50 μ g/ml)、さらに抗真菌剤の代表的薬剤のAmphotericin B (50 ng/ml) などはCASMCs細胞の増殖に対して、24～72時間のいずれの観察時点においても阻害作用を示すことはなかった。

【0036】

【実施例4】

細胞周期解析法：上記で示されてきた、RXMのCASMCs細胞への直接的増殖阻害作用が、細胞周期におけるいかなる時点で効果を現しているかについて、フローサイトメトリを用いた実験によって、さらなる検討を行った。

具体的には、以下の手順及び条件でフローサイトメトリを用いた測定を行った。70%エタノールで30分間固定後、RNase (5 μ g/ml) で30分間インキュベートした。その後、propidium iodide (10 μ g/ml) で30分間インキュベートし、FACScan (Becton Dickinson 社)で測定した。

尚、細胞周期の移行する程度は、具体的には、ModFit LT ソフトウェアでDNAヒストグラム解析を行い、全体の細胞に対する%で示した。

【0037】

図3に示されるように、RXMの10 μ g/mlの濃度において、細胞周期におけるG1期からS期に向かう段階を統計的に有意なレベルで抑制していることが示されたが、一方、細胞周期のS期からG2/M期に向かう段階には阻害作用が認められなかった。

【0038】

【実施例5】

ウエスタンブロット法(1)：上記のRXMによるCASMCs細胞におけるG1期からS期に向かう段階の抑制が、本細胞周期移行に必須の細胞内分子であるとされているリン酸化網膜芽腫遺伝子産物 (retinoblastoma gene products : phosphorylated Rb) を指標として、本分子のリン酸化の阻害に基づくものであるかを、ウエスタン・プロッティング法においてphosphorylated Rbを特異的に認識するモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology社製) を用いて解析した。

【0039】

この実験において、phosphorylated Rbは通常の条件下ではウエスタン・プロット法では検出出来ないレベルであるため、5%牛胎児血清 (FBS) , 2ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (human basic fibroblast growth factor) , 5 μ g/ml 牛インシュリン、及び0.5ng/ml ヒト上皮増殖因子 (human epidermal growth factor) を培養液に添加することによって、CASCs細胞をマイトージェンにより刺激し、活性化状態を生起させphosphorylated Rb発現量を増加させた状態において後、解析を行った。

具体的には、以下の手順及び条件で、活性化状態を生起させ、ウエスタン・プロットを実施した。

SDSゲルで電気泳動後PVDF膜に転写し、ドライミルクでブロッキング後、一次抗体 (抗phosphorylated Rbウサギ抗体) 及び標識二次抗体 (抗ウサギIgGマウス抗体) で順次インキュベーションとした。その後、アルカリフォスファターゼイムノプロットキットを用いて発色させ、デンストメーターで定量した。

【0040】

その結果、図4に示されるように、RXMの1~10 μ g/mlの濃度において、CASCs細胞におけるphosphorylated Rbの生成を明瞭に抑制していることが示された。

【0041】

【実施例6】

ウエスタン・プロット法 (2) : 上記RXMによるCASCs細胞におけるphosphorylated Rbの生成阻害が、如何なる細胞内分子を修飾することで生起しているかを検討する目的で、当該細胞内分子を制御する分子として知られているサイクリン依存性キナーゼ複合体 (CDKIs) に着目し、その中心的分子であるCDKIs-p27およびCDKIs-p21について、実施例5と同様な条件下でウエスタン・プロット法によって解析を行った。

【0042】

CDKIs-p27およびCDKIs-p21分子はphosphorylated Rbと同様に、通常の細胞では発現は弱くウエスタン・プロット法によっても検出出来ないレベルであるため、実施例5と同様な条件下でマイトージェンによって細胞を活性化状態にしたも

のを解析の対象とした。

【0043】

その結果、図5に示されるように、RXMの1～10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、CASMCS細胞におけるマイトージェン刺激存在下におけるCDKIs-p27の発現は、RXMの濃度依存的に明瞭に増加していたが、一方、CDKIs-p21の発現には明瞭な差異が認められなかった。

【0044】

こうしたウエスタン・プロット法を用いた細胞内分子の解析の結果、RXMによるCASMCS細胞への直接的増殖阻害活性は、主として、サイクリン依存性キナーゼ複合体のなかのCDKIs-p27の発現増強効果によってもたらされた、細胞周期移行におけるG1からS期への移行阻害に基づくものであることが示された。

【0045】

【発明の効果】

本発明によれば、14員環マクロライド化合物は血管平滑筋細胞の増殖を抑制するため、14員環マクロライド化合物を有効成分として含有する血管平滑筋の増殖に起因する疾患、例えば、血管平滑筋の増殖に伴う動脈硬化症及び慢性血管硬化症、並びに、脳血管狭窄症、腎血管狭窄症、及び心筋梗塞症等に対する有効な予防治療剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、RXMによるCASMCS細胞への直接的増殖阻害効果を示している。図中complete mediumとは、実施例1に記載した組成の完全栄養培地を示し、serum freeとはこの完全栄養培地から必須栄養素であるところの牛由来血清を添加していない培地を示す。

縦軸は細胞密度を表すところの、光波長450nmにおける吸収度である。Figure1Aの横軸は培養時間を示し、Figure1Bの横軸はRXMの濃度を示す。

【図2】

図2は、一般的抗菌剤および抗真菌剤によるCASMCS細胞への直接的増殖阻害効果を示している。図中complete medium、serum freeとは図1における説明と同

様であり、ABPCとはampicillinを指す。

縦軸は細胞密度を表すところの、光波長450nmにおける吸収度であり、横軸は培養時間を示す。

【図 3】

図 3 は、フローサイトメトリを用いての細胞周期を解析した結果であり、上段の図がG1期からS期に移行する程度を示したもので、下段の図がS期からG2/M期への移行の程度を示したものである。

縦軸は細胞周期の移行する程度を%で表したものであり、横軸はRXM (10 μ g/ml) の有無を表す。

【図 4】

図 4 は、ウエスタンブロット法によりphosphorylated Rb蛋白質を解析した結果を示す電気泳動の写真である。

写真の左に記載された数字はphosphorylated Rbの分子量(K Dalton)を表す。写真下のquiescentはphosphorylatedされていない(非活性化状態の) Rb分子を入れてあるレーンを示し、その隣からはRXMの濃度を示す。

【図 5】

図 5 は、ウエスタンブロット法によりCDKIs蛋白質 (p21およびp27)を解析した結果を示す電気泳動の写真である。

写真の左に記載された数字はCDKIsの分子量(K Dalton)を表す。上段の写真はCDKIs-p21についての解析結果の写真であり、下段の写真はCDKIs-p27についてのものである。写真下のquiescentはマイトージェン非刺激下の活性化されていない細胞から回収した(非活性化状態の) CDKIs分子を入れてあるレーンを示し、その隣からはRXMの濃度を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

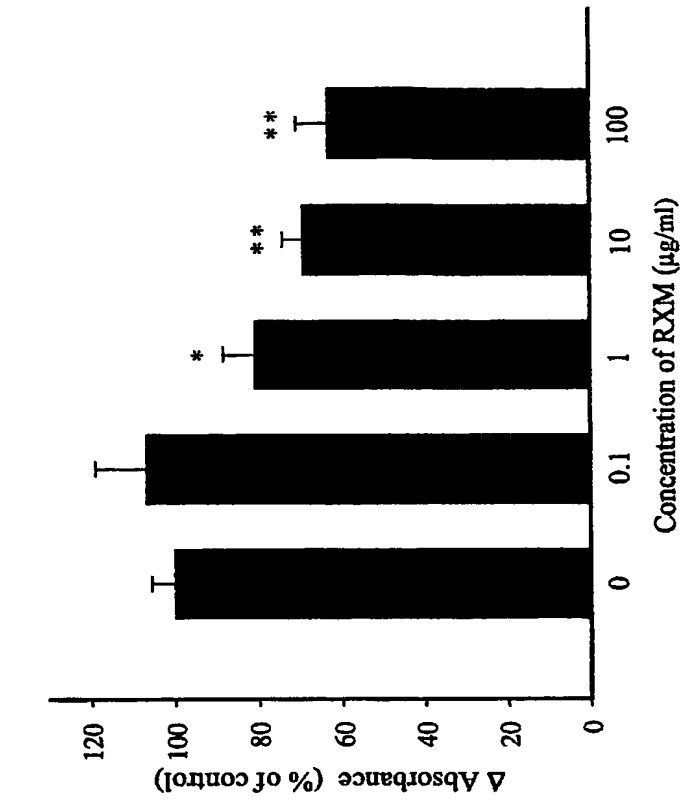


Figure 1B.

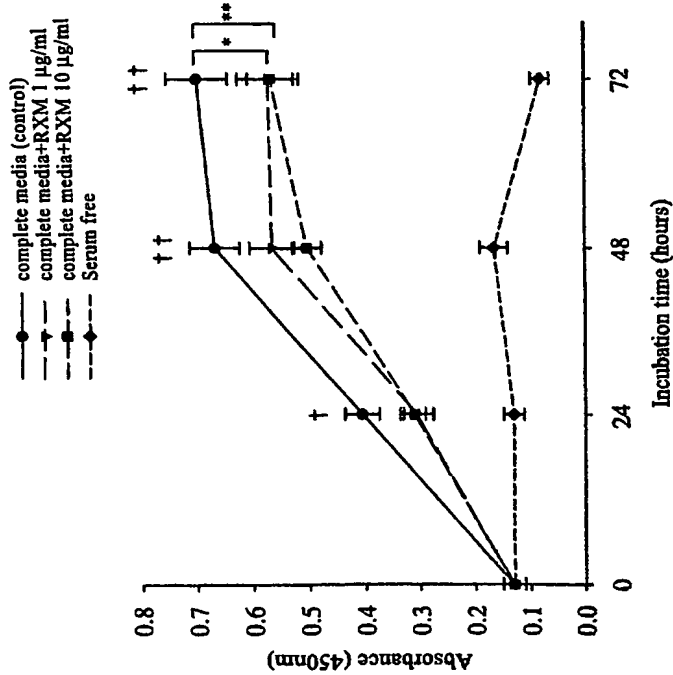


Figure 1A.

【図 2】

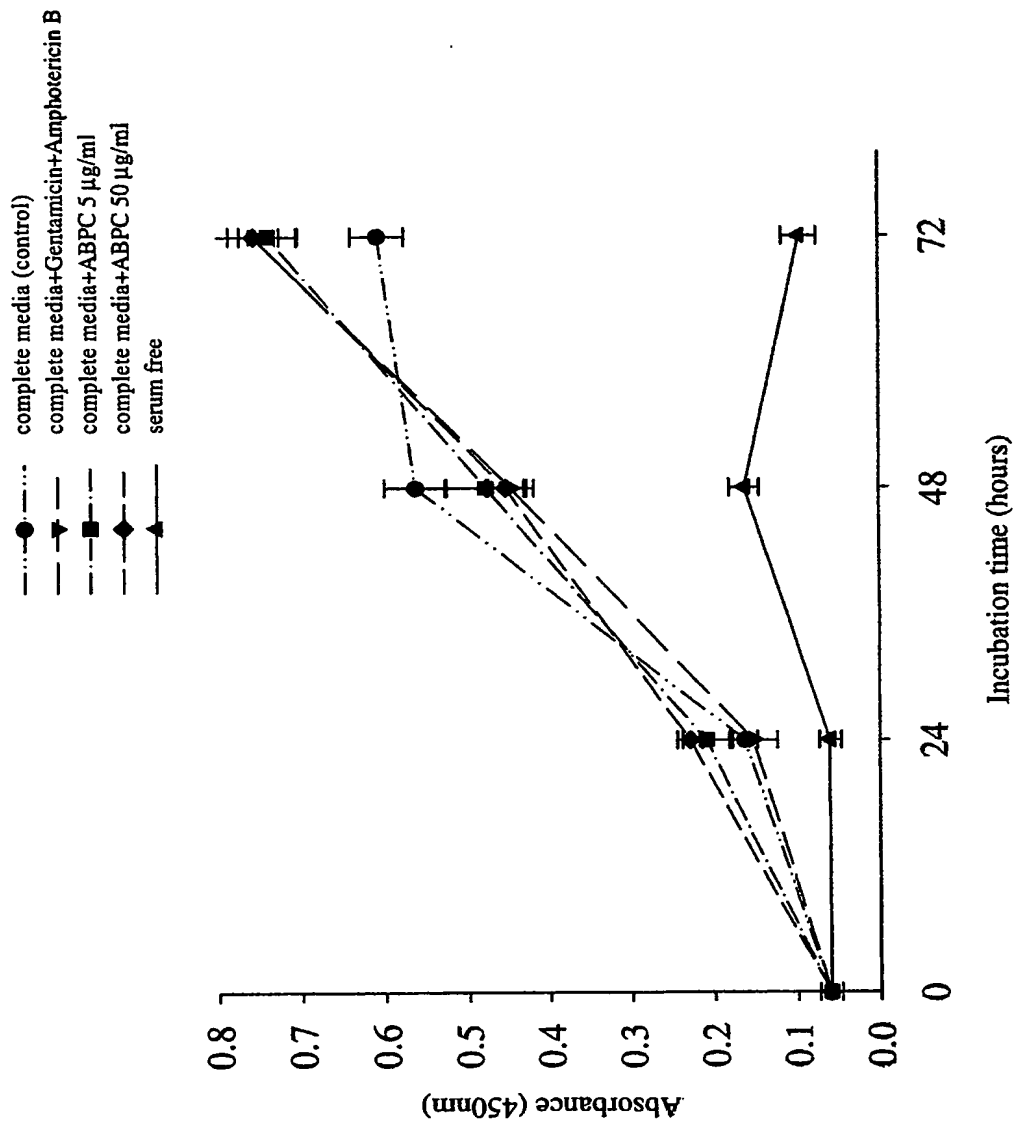


Figure 2.

【図 3】

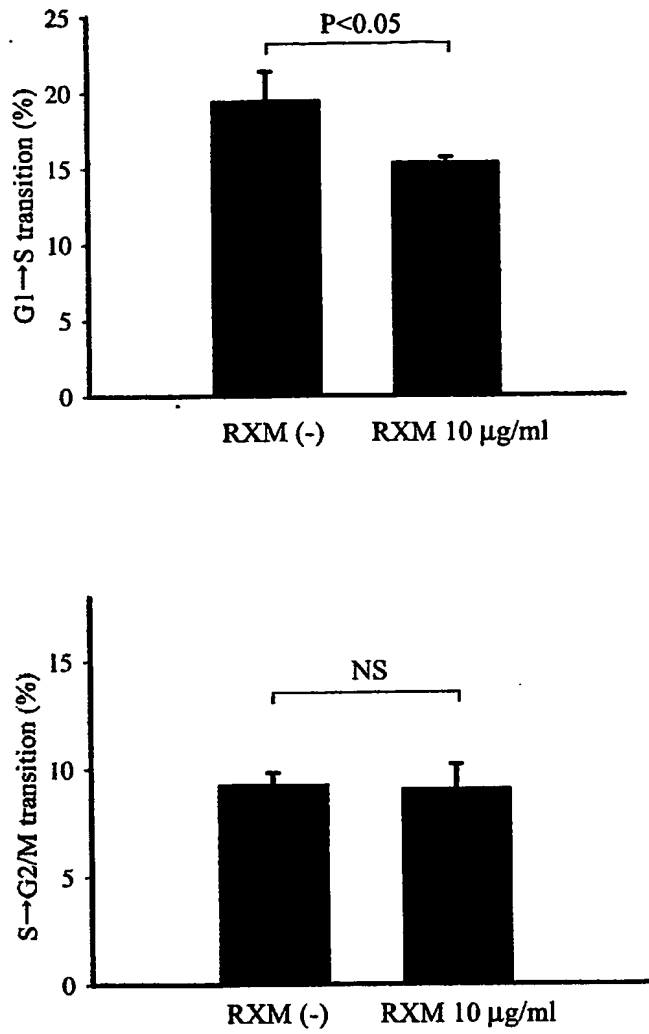
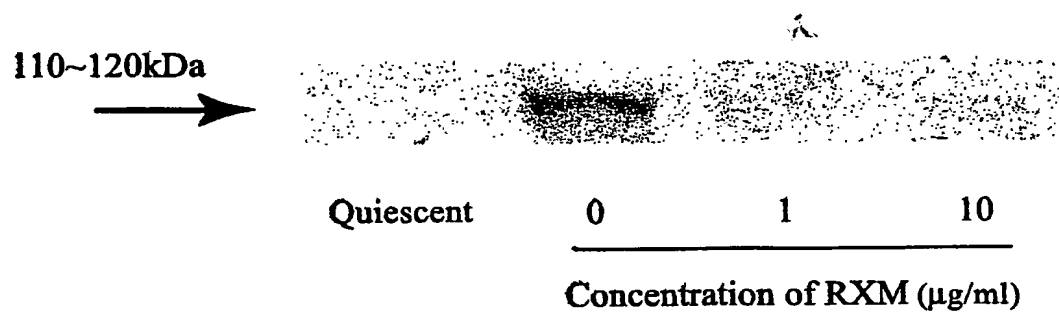


Figure 3

【図 4】

Figure 4



【図 5】

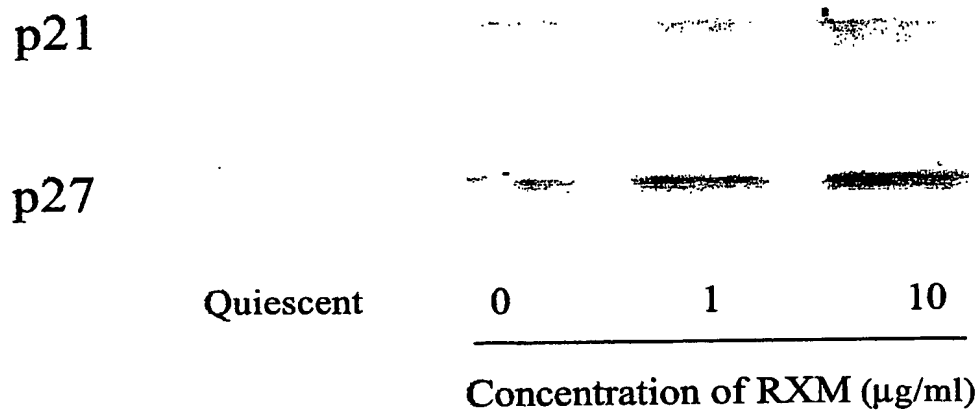


Figure 5.

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血管平滑筋増殖に起因する疾患、例えば、心臓の冠動脈閉塞をバルーンで拡大する治療後に起こる再閉塞等に対する、新規な予防治療剤を提供すること。

【解決手段】 14員環マクロライド化合物、具体的には、エリスロマイシン又はエリスロマイシン誘導体、ロキシスロマイシン又はロキシスロマイシン誘導体を有効成分とする、血管平滑筋増殖の抑制剤、サイクリン依存性キナーゼ複合体発現増強剤、及び血管平滑筋の増殖に起因する疾患の予防治療剤、並びに、該疾患の治療方法等を提供する。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-120068
受付番号	50300688434
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 4月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月24日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
 【提出日】 平成15年10月31日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-120068
 【承継人】
 【識別番号】 503360115
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
 【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-120068

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 2 0 0 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**